

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ АНАЛИЗ КЛЕТОК ЛИНИИ HELA - ПРОДУЦЕНТОВ РЕКОМБИНАНТНОГО ПЕПТИДОГЛИКАН-РАСПОЗНАЮЩЕГО БЕЛКА PGLYRP1 НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ РАЗВИТИЯ ИНФЕКЦИИ *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

П.А. Бобровский*, А.К. Ларин, Н.Ф. Полина, В.Н. Лазарев

Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины,
119435, Москва, ул. Малая Пироговская, 1а; *e-mail: pbobrovskiy@gmail.com

Пептидогликан-распознающие белки человека (PGLYRP) являются компонентами врожденного иммунитета, проявляющими антибактериальную активность. В данной работе получена клеточная линия, секретирующая рекомбинантный PGLYRP1 в культуральную среду. Проведено транскрипционное профилирование клеточных линий, синтезирующих PGLYRP1 после заражения *C. trachomatis* на разных стадиях развития инфекции. Методом полнотранскриптомного профилирования на микрочипе HumanHT-12 v4 Expression BeadChip по протоколу Illumina Direct Hybridization Whole-Gene Expression Assay изучена дифференциальная экспрессия генов. После кластеризации образцов и биоинформатического анализа обнаружено около 100 дифференциально экспрессирующихся генов в ответ на заражение *C. trachomatis*. Клетки, продуцирующие PGLYRP1 при заражении *C. trachomatis*, имели транскрипционный профиль, схожий с незараженными клетками.

Ключевые слова: *Chlamydia trachomatis*; PGLYRP; рекомбинантные белки; транскриптомика**DOI:** 10.18097/BMCRM00113

ВВЕДЕНИЕ

Пептидогликан-распознающие белки человека (PGLYRP) являются компонентами врожденного иммунитета, обладающими антибактериальной активностью [1]. PGLYRP обнаружены у всех млекопитающих и некоторых других таксономических групп [2]. У млекопитающих описано четыре белка (PGLYRP1-4), которые были идентифицированы как бактерицидные белки [3]. Показано, что PGLYRP распознают не только бактериальный пептидогликан, но и липополисахариды в наружной мембране грамотрицательных бактерий [4]. Эти белки проявляют бактерицидную активность относительно различных видов бактерий *in vitro* и *in vivo* [5]. Механизм действия пептидогликан-распознающих белков, описанный в 2010 г., включает их связывание с пептидогликаном клеточной стенки бактерий или липополисахаридами наружной мембраны и активацию защитной системы ответа на стресс у бактерий; это приводит к гибели клетки вследствие гиперактивации данной системы [6]. В экспериментах на грамположительных и грамотрицательных бактериях связывание PGLYRP с клеточной стенкой (*Bacillus subtilis*) или мембраной (*Escherichia coli*) приводило к активации двухкомпонентных систем ответа на стресс [7]. Отдельный интерес представляло изучение активности PGLYRP против таких внутриклеточных патогенных паразитов, как *Chlamydia trachomatis* в связи с особенностями жизненного цикла и строением клетки этой бактерии. Жизненный цикл хламидий характеризуется существованием двух форм: инфекционных, метаболически неактивных элементарных телец (ЭТ), и неинфекционных, метаболически активных

ретикулярных телец (РТ) [8]. Обе формы бактерий содержат в составе мембран липополисахариды [9], недавно в клеточной стенке был обнаружен пептидогликан [10].

Ранее нами были получены рекомбинантные PGLYRP человека и продемонстрирована их антихламидийная активность [11]. Было показано, что эти рекомбинантные PGLYRP не только ингибируют развитие хламидийной инфекции при инкубации элементарных телец в растворе с рекомбинантными PGLYRP, но и уменьшают инфекционную способность дочерних элементарных телец [11]. Однако эти данные не позволяют оценить, на каком этапе проявляется антихламидийная активность PGLYRP. Целью данного исследования было изучение изменения уровня экспрессии генов в линии клеток, продуцирующих рекомбинантный PGLYRP1 в ответ на заражение их элементарными тельцами *C. trachomatis*. В качестве контроля использовали клеточную линию, в которой встроены дефектный ген PGLYRP1.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии и бактериальные штаммы

В работе использовали штамм *E. coli* TOP10 («Invitrogen», США), генотип F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ-, элементарные тельца штамма *C. trachomatis* D/UW-3/Cx (ATCC VR-885), очищенные путем ультрацентрифугирования в градиенте урогографина [12].

В работе использовали клеточную линию HeLa (ATCC CCL-2, США).



Культивирование эукариотических клеток

Клетки линии HeLa культивировали в среде DMEM high glucose + pyruvate + Glutamax («Thermo Fisher Scientific», США) с 10% инактивированной эмбриональной телячьей сывороткой («Thermo Fisher Scientific») и гентамицином («Thermo Fisher Scientific») 10 мкг/мл, при температуре 37°C в присутствии 5% CO₂. При моделировании хламидийной инфекции клетки HeLa рассевали в 24-луночные планшеты («Corning», США) в количестве ≈10⁵ клеток на лунку и культивировали в течение 24 ч до достижения 90% конфлюентности. Клетки заражали элементарными тельцами *C. trachomatis* с множественностью инфекции от 0.9 до 1 BOE/клетку (включение образующих единиц). Клетки центрифугировали в течение 1 ч при 900 g. После центрифугирования клетки культивировали в термостате при температуре 37°C в присутствии 5% CO₂.

Полимеразная цепная реакция

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в объеме 25 мкл с использованием 1–10 нг ДНК; 5 пмоль каждого праймера, Thersus полимеразы («Евроген», Россия) с соответствующим буферным раствором. Режим амплификации: 95°C/120 с – 1 цикл; 95°C/15 с, 60°C/15 с, 72°C/60 с на 1.5 т.п.н. – 25 циклов; 72°C/120 с – 1 цикл. ПЦР-фрагменты разделяли в 1% агарозном геле и выделяли из геля набором DiaGene («Диа-М», Россия).

Конструирование плазмиды с дефектным геном PGLYRP1

Для получения плазмиды с дефектным *PGLYRP1* был использован сайт-направленный мутагенез. Для этого использовали вектор pEGFP-N1-PGLYRP1, полученный ранее [11]. С помощью праймеров pglf_hind/pglstpR и pglstpF/pglr_sal (дополнительные материалы, табл. 1) были амплифицированы два фрагмента. Для сборки фрагмента из двух частей, 5 нг каждого из выделенных фрагментов с первого этапа смешивали, добавили смесь для ПЦР за исключением праймеров. Программа амплификации: первичная денатурация 120 с при 95°C, 10 циклов в режиме: 95°C – 10 с, 60°C – 10 с, 72°C – 60 с. Далее, были добавлены праймеры pglf_hind/ pglr_sal, после чего было проведено еще 20 циклов в режиме: 95°C – 10 с, 60°C – 10 с, 72°C – 60 с. В результате был получен ПЦР-фрагмент, соответствующий структурной части гена *PGLYRP1* с мутацией G117A, приводящей к аминокислотной замене W39Stop. Полученный полноразмерный фрагмент выделяли из геля, расщепляли эндонуклеазами рестрикции HindIII и SalI («Thermo Fisher Scientific»). Реципиентную плазмиду pEGFP-N1-PGLYRP1 обрабатывали теми же эндонуклеазами, лигировали с полученным фрагментом лигазой фага T4 («Thermo Fisher Scientific») и трансформировали лигазной смесью клетки *E. coli* Top10, которые высевали на чашки Петри с агаризованной средой LB, содержащей 30 мкг/мл канамицина («Sigma», США). Выросшие колонии анализировали путем ПЦР с использованием олигонуклеотидов N1 и N2 (дополнительные материалы, табл. 1) Колонии, содержащие плазмиды со вставкой, высевали в жидкую среду LB, затем из культуры выделяли плазмидную ДНК. Последовательность

плазмид подтверждали методом циклического секвенирования по Сэнгеру с использованием капиллярного секвенатора AbiPrism 3730xl («Applied Biosystems», США). Полученная плазида получила название pEGFP-N1-PGLYRPm (m – мутантная).

Получение линии клеток HeLa – продуцента PGLYRP1

Для трансфекции клеток HeLa использовали плазмиды pEGFP-N1-PGLYRP1 и pEGFP-N1-PGLYRPm, выделенные препаративно с помощью набора Qiagen Plasmid Maxi Kit («Qiagen», США). Для трансфекции клетки высевали в лунки 24-луночного планшета по 10⁵ в лунку (так, чтобы во второй день эксперимента достичь 80-90% конфлюентности). Во второй день эксперимента клетки трансфицировали с помощью набора Lipofectamine 3000 («Thermo Fisher Scientific»), используя 1 мкг плазмидной ДНК на лунку 24-луночного планшета, количества используемых реактивов Lipofectamine 3000 и P3000 составляли по 0.5 мкл на лунку. В пробирке №1 ДНК смешивали с реагентом P3000 и доводили до объема 25 мкл средой Opti-MEM («Thermo Fisher Scientific»). В пробирке №2 Lipofectamine 3000 также доводили до объема 25 мкл средой Opti-MEM. Далее добавляли по каплям содержимое пробирки №1 к содержимому пробирки №2, перемешивали пипетированием несколько раз. После 5-минутной инкубации при комнатной температуре полученные комплексы в объеме 50 мкл по каплям добавляли к клеткам. Через 48 ч клеткам меняли среду на DMEM с 500 мкг/мл антибиотика G418 («Gibco», США) и культивировали в течение 2–3 недель до гибели всех нетрансфицированных клеток в контрольной лунке. Выжившие клоны переносили в новый планшет для дальнейшего культивирования и анализа.

Выделение РНК

Выделение суммарной РНК проводили из культуры клеток реактивом для выделения суммарной РНК ExtractRNA («Евроген»), из расчета 1 мл реагента на 10 см² поверхности культуральной посуды согласно инструкции производителя. Количество выделенной суммарной РНК определяли с помощью Qubit® 2.0 Fluorometer («Life Technologies», США) с использованием набора Quant-iT™ RNA Assay Kit, 5–100 нг («Thermo Fisher Scientific»). Суммарную РНК (5 мкг в образце) обрабатывали ДНКазой I (2 единицы активности (е.а.)) («Thermo Fisher Scientific») в присутствии 20 е.а. ингибитора рибонуклеаз в течение 30 мин при 37°C, далее была проведена фенол-хлороформная экстракция с последующим осаждением этанолом по стандартному протоколу [13].

Реакция обратной транскрипции

Для проведения реакции обратной транскрипции использовали набор RevertAid RT Reverse Transcription Kit («ThermoFisher Scientific»), олигонуклеотиды, комплементарные поли-А последовательности (T20), дезоксинуклеозидтрифосфаты. Для реакции обратной транскрипции использовали 1 мкг суммарной РНК, 100 пмоль праймера T20, 20 е.а ингибитора рибонуклеаз, 200 е.а. обратной транскриптазы. Компоненты реакции смешивали согласно рекомендациям производителя и инкубировали в

течение 1 ч при 42°C, а затем инактивировали ферменты в течение 5 мин при 70°C. Полученную кДНК использовали для амплификации структурной части гена PGLYRP1 и последующего секвенирования.

Вестерн-блот гибридизация

Образцы культуральной жидкости линий HeLa-PGLYRP1 и HeLa-PGLYRP1m осветляли центрифугированием (300 g, 10 мин), добавляли 4-х кратный буферный раствор Лэммли, инкубировали 5 мин при 95°C. Образцы разделяли в 13,5%-SDS- полиакриламидном геле в трис-глициновом буферном растворе (25 mM Tris-OH, 250 mM глицин, 0,1% SDS). Далее проводили полусухой перенос белков на PVDF мембрану («Amersham Biosciences», США) при 1 мА на 1 см² геля в течение 30 мин. Мембрану инкубировали в PBST (PBS, 0,1% Tween-20) с 5% молоком («BioRad», США) 30 мин и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с первичными антителами на полигистидиновую последовательность (Takara, США) в разведении 1 : 10000. После трех промывок в PBST, мембрану инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре со вторичными антителами овцы против иммуноглобулинов G мыши, меченными пероксидазой хрена («Amersham Biosciences») в разведении 1 : 10000. Мембрану проявляли с использованием набора ECL Plus («Amersham Biosciences») согласно инструкции производителя. Сигнал детектировали помощью системы гель-документирования ChemiDoc MP («BioRad»).

Транскриптомное профилирование

Для амплификации мРНК с помощью набора Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit («Ambion», США) использовали 500 нг суммарной РНК согласно рекомендациям производителя. Количество полученной РНК определяли с помощью Qubit® 2.0 Fluorometer.

Для оценки экспрессии по протоколу Illumina Direct Hybridization Whole-Genome Expression Assay использовали 750 нг полученной кРНК. Использовали биочипы HumanHT-12 v4 Expression BeadChip («Illumina», США), систему iScan («Illumina») и программное обеспечение Genome Studio v1.9.0 в соответствии с инструкциями производителя.

Биоинформатический анализ данных

Первичную обработку данных проводили с помощью программы GenomeStudio Gene Expression Module («Illumina»), используя пакет R (R version 3.1.0 (2014-04-10)) [14]. Обработку данных проводили в оболочке R-Studio Desktop 0.99.903. Схожесть между образцами определяли на основании корреляции по Спирмену. Далее проводили вычисление среднего значения сигнала для каждого гена, после чего высчитывали значение дифференциальной экспрессии каждого гена. Вычисление дифференциальной экспрессии проводили по формуле (1), где FC – изменение уровня экспрессии гена, X₀ и X_c – среднее значение уровня экспрессии гена в исследуемом образце и в контроле соответственно.

$$FC = \log_2 \frac{X_0}{X_c} \quad (1)$$

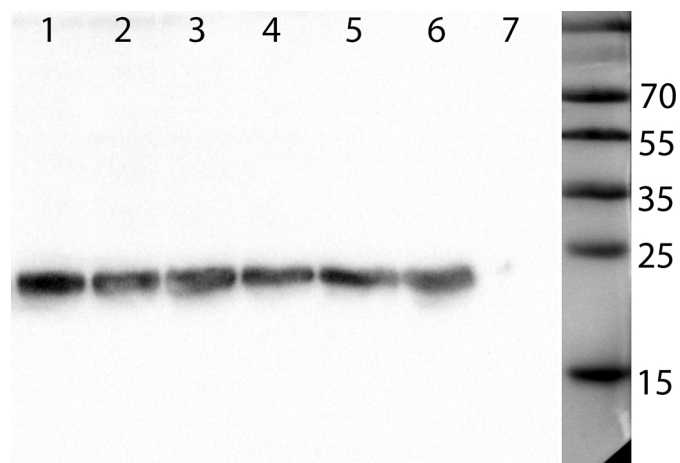


Рисунок 1. Вестерн-блот культуральной жидкости клеточных линий HeLa-PGLYRP1 и HeLa-PGLYRP1m. Мембрану инкубировали с первичными антителами против полигистидиновой последовательности. Образцы 1,2,3 – выделенный рекомбинантный PGLYRP1 в количестве 50 нг, 25 нг, 10 нг, Образцы 4,5,6 – три клона HeLa-PGLYRP1. 7 - HeLa-PGLYRP1m, справа маркер молекулярных масс (кДа).

Для упрощения интерпретации данных для каждой временной точки использовали свой контроль – транскрипционный профиль незараженной линии PGLYRP1m.

Поиск генов, экспрессия которых достоверно отличается в группах образцов осуществляли при помощи t-критерия Стьюдента с поправкой на множественность сравнений методом FDR по Бенжамини-Ходжбергу [15]. Для визуализации использовали пакеты ggplot2 [16] и RcolorBrewer [17], а для построения диаграмм Венна был использован скрипт Venn diagram generator [18].

Функциональная аннотация дифференциально экспрессирующихся генов в терминах Gene Ontology (GO) была проведена с использованием сервиса WEB-based GENE SeT Analysis Toolkit.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение линий продуцентов PGLYRP1 и детекция белка

Выросшие клоны после селекции на G418 анализировали путем амплификации фрагмента структурной части гена PGLYRP1. Положительные клоны анализировали на наличие мРНК путем реакции обратной транскрипции и детекции целевого белка при помощи вестерн-блот гибридизации.

Из 12 отобранных клонов для каждой из линий HeLa-PGLYRP1 и HeLa-PGLYRP1m было отобрано по 3 клона, содержащих целевой участок. Для дальнейшей работы было выбрано по одному клону.

Для детекции рекомбинантного белка образцы культуральной жидкости отбирали на следующий день после пересева клеток и по достижению полного покрытия лунки. В качестве контроля использовали ранее выделенный рекомбинантный PGLYRP1 с известной концентрацией. В результате рекомбинантный белок PGLYRP1 был обнаружен в культуральной жидкости линии HeLa-PGLYRP1, но не в культуральной жидкости линии HeLa-PGLYRP1m (рис. 1). Во всех трех клонах количество

Таблица 1. Схема эксперимента по транскриптомному профилированию клеточных линий, синтезирующих PGLYRP1 после заражения *C. trachomatis* на разных стадиях развития инфекции.

Клеточная линия/время	1 ч	24 ч	72 ч
HeLa-PGLYRP1	A1, A2	A3, A4	A5, A6
HeLa-PGLYRP1m	A7, A8	A9, A10	A11, A12
HeLa-PGLYRP1+C.t.	A13, A14	A15, A16	A17, A18
HeLa-PGLYRP1m+C.t.	A19, A20	A21, A22	A23, A24

Примечание. В эксперименте использовали 2 чипа, по 12 образцов на чипе. Для каждой пары образец-время был сделан повтор. Для упрощенной работы были даны рабочие названия A1...A24, C.t. – *C. trachomatis*.

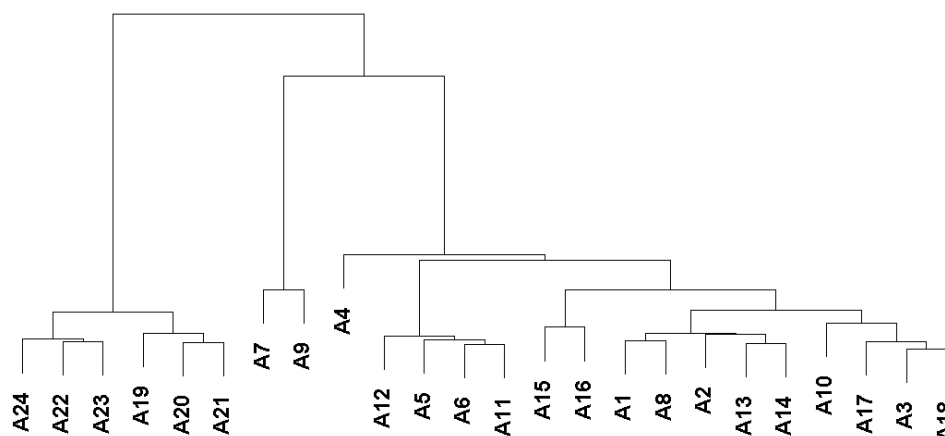


Рисунок 2. Кластерный анализ образцов. Все данные с двух чипов были кластеризованы по схожести значений флуоресценции после сортировки данных по уровню значимости детектированного уровня флуоресценции ($p \leq 0.05$).

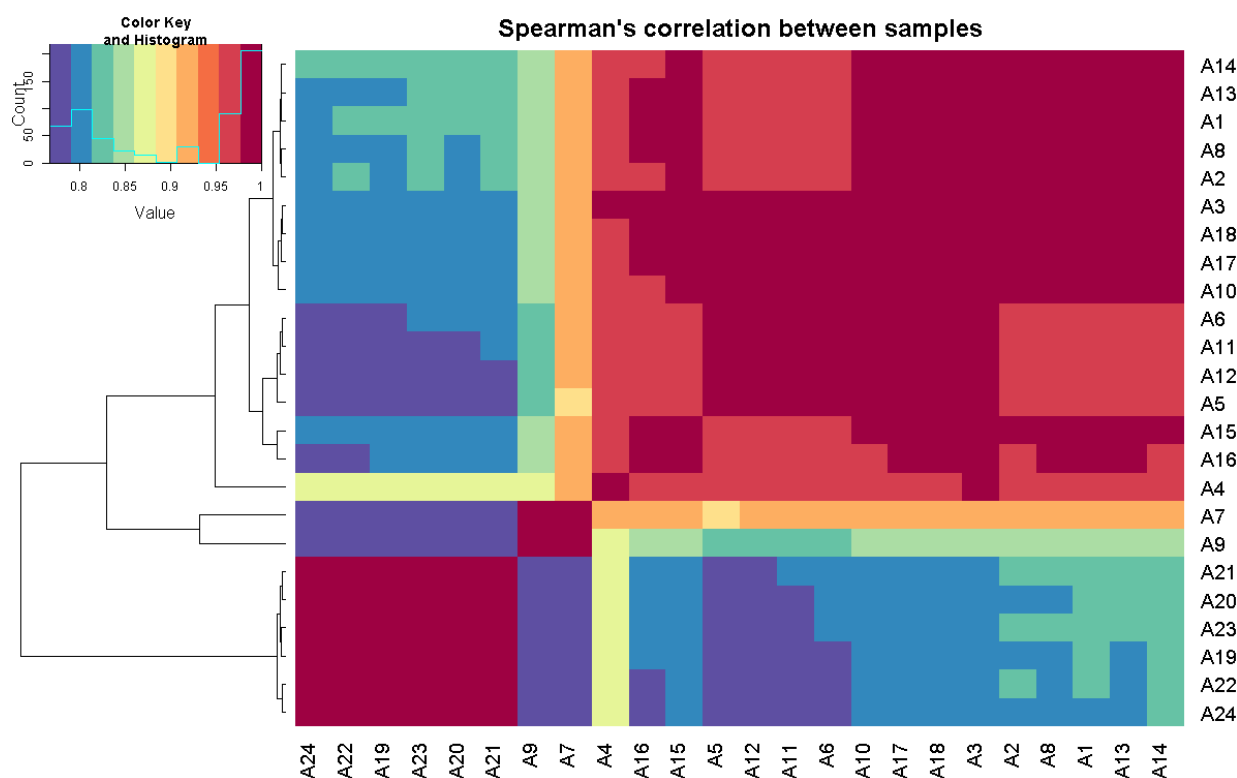


Рисунок 3. Тепловая карта корреляционного анализа исследуемых образцов. Слева отображена кластеризация образцов. Корреляция высчитывалась для всех 24 образцов с двух чипов после сортировки данных по уровню значимости детектированного уровня флуоресценции ($p \leq 0.05$).

PGLYRP1 было одинаковым. С помощью программного обеспечения ImageJ был проведен денситометрический анализ электрофореграммы для примерного определения концентрации PGLYRP1 в культуральной жидкости. В качестве сравнения использовали рекомбинантный PGLYRP1 с известной концентрацией. Было показано, что

продукция PGLYRP1 во всех клонах соответствует 0.1 мг/л культуральной среды. В результате была отобрана клеточная линия HeLa, секретирующая рекомбинантный PGLYRP1 человека, и линия, несущая встроенный дефектный ген PGLYRP1m.

Таблица 2. Список общих дифференциально экспрессирующихся генов клеток HeLa-PGLYRP1m через 1 ч, 24 ч и 72 часа после заражения *C. trachomatis*

Пересечения	Названия генов
1ч 24ч 72ч	<i>LOC441019 FURIN NOTCH1 OSAP PYGL</i>
1ч 24ч	<i>NAPRT1 SKAP2</i>
1ч 72ч	<i>F2RL1 AKRIC3 SPARC LTBP2 COL5A1 ENG COL4A1 EPAS1 LRIG1 HS.572219 HEBP1 COL18A1 P4HA2 TGFBR2 LAMB2 PLEKHG3 LOC646821 LOC652685 LXN RAB11FIP5 VAMP5 PLXNA2 CYBRD1 CD59 TGFBI PLK2 IGFBP7 CLDN5 KDELR3 BST2 LRP10 HYI PRSS23 GAL P2RX4 APLN TMEM184B CD99 KIF1C PDLIM1 C1ORF54 CTGF TMEM8 TMEM166 BOK ELF4 MARCH3 GADD45B GABARAPL1 SPOCK1 IFI27</i>
24ч 72ч	<i>APLP2 SALL2</i>
1ч	<i>IFI16 NUA1 MIR1974 SORT1 LOC729985 PARVA HS.5724 COL4A2 CRYBB2 MYH9 MGC39900 EHD4 PPP1R16B LDB2 S100A6 IGF2BP2 TNS3 LOC100133999 DDIT4 ESAM BGN FAM38A HSP-BL2 RAB33A SH2B3 LYL1 TACC1 ENO2 TNFRSF14 B2M STAT5A SGK LEPREL2 AXUD1 EFEMP1 USP11 NEK6 PIK3IP1 IFITM2</i>
24ч	<i>MT2A NEXN C20ORF127 SEL1L3 MTE RRAGD SEMA3F</i>
72ч	<i>HBEGF WIP1 SERPINE1 EVI1 RRBPI SNCA GDF15 LOC646723 CSRP1 PXN C5ORF32 C1QTNF5 LOC653506 FRMD6 GRM2 RASIP1 VIM MARCH4 SPSB1 GNAI2 HS.193557 TPM2 FLII PPP1R3F CANX IRAK2 C10ORF2 CLDN11 FOXO1 EPHA2 CRYL1 HTRA1 C1ORF115 C21ORF63 TPP1 MVP OSTF1 ISG15 MBOAT7 FAM174B VPS37D LOC399959</i>

Примечание. В таблице представлены списки общих генов для разных временных промежутков, основанных на данных анализа диаграмма Венна (первые четыре строки). Нижние три строки показывают уникальные гены для каждого из трех временных промежутков.

Транскриптомное профилирование

Для выполнения транскриптомного профилирования были использованы клеточные линии HeLa-PGLYRP1 и HeLa-PGLYRP1m. Клетки были рассеяны в 24-луночные планшеты и заражены элементарными тельцами *C. trachomatis*. Контролем служили клетки, которые не подвергались заражению.

После заражения клеток центрифугированием клетки инкубировали при температуре 37°C в присутствии 5% CO₂ в течение 1 ч, 24 ч и 72 ч, после чего проводили выделение суммарной РНК из клеток.

На первом этапе подготовки образцов из клеток было выделено 8–15 мкг суммарной РНК. После обработки образцов ДНКазой I были получены образцы, содержащие по 2–4 мкг суммарной РНК без ДНК-примесей.

В ходе амплификации матричной РНК с помощью набора Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit были получены кРНК-библиотеки (РНК, комплементарная дцДНК, полученной в ходе обратной транскрипции) с выходом 1–15 мкг.

После сканирования сигналов флуоресценции с зондов микрочипа получали первичные данные в виде таблицы с интенсивностями флуоресценции всех зондов, достоверностью детекции сигнала (*p*-value) по каждому из 12 образцов с одного чипа. Образцам были присвоены рабочие названия (табл. 1). Для каждого образца был сделан биологический повтор.

На первом этапе был проведен кластерный анализ образцов (рис. 2). Для этого из всех полученных данных сигналов флуоресценции были отсеяны те гены, уровень значимости сигнала которых был больше $p > 0.05$. Этот уровень значимости был рассчитан в программе GenomeStudio после усреднения значения уровня сигнала для каждого гена (4–5 зондов на ген). Так же был проведен корреляционный анализ данных после фильтрации, результаты которого были представлены в виде тепловой карты (рис. 3).

Аннотация дифференциально экспрессирующихся генов в терминах GO

Для аннотации дифференциально экспрессирующихся генов в терминах GO с помощью скриптов WEBGESTALT отбирали дифференциально экспрессирующиеся гены, достоверно отличающиеся от контроля по модулю в 3 и более раз при уровне значимости $p \leq 0.01$. Полученный список генов использовали для дальнейшего анализа. Для временной точки «1 ч» в список вошло 97 генов, включая 86 генов с увеличенным уровнем экспрессии. Для временной точки «24 ч» было определено 16 генов, включая 14 генов с увеличенным уровнем экспрессии. Для точки «72 ч» было определено 100 генов, включая 92 гена с увеличенным уровнем экспрессии (дополнительные материалы, табл. 2S). Дифференциально экспрессирующиеся гены были найдены только для зараженных клеток линии HeLa-PGLYRP1m. В зараженных клетках линии HeLa-PGLYRP1 достоверно отличался от контроля только уровень самого PGLYRP1. Аннотированные данные представлены в трех группах генной онтологии: молекулярная функция, клеточный компонент и биологический процесс. Списки аннотаций были получены для двух временных промежутков: 1 ч и 72 ч (рис. 4, дополнительные материалы, рис. 1S).

Для поиска общих дифференциально экспрессирующихся генов в клетках на разных этапах развития хламидийной инфекции были построены диаграммы Венна (рис. 5). В результате был обнаружен 51 общий ген между временными точками «1 ч» и «72 ч». При этом временной интервал «24 ч» имеет по 2 общих гена временными точками «1 ч» и «72 ч» (табл. 2).

Таким образом, нами был получен транскриптомный профиль клеток HeLa-PGLYRP1m на различных стадиях заражения *C. trachomatis*.

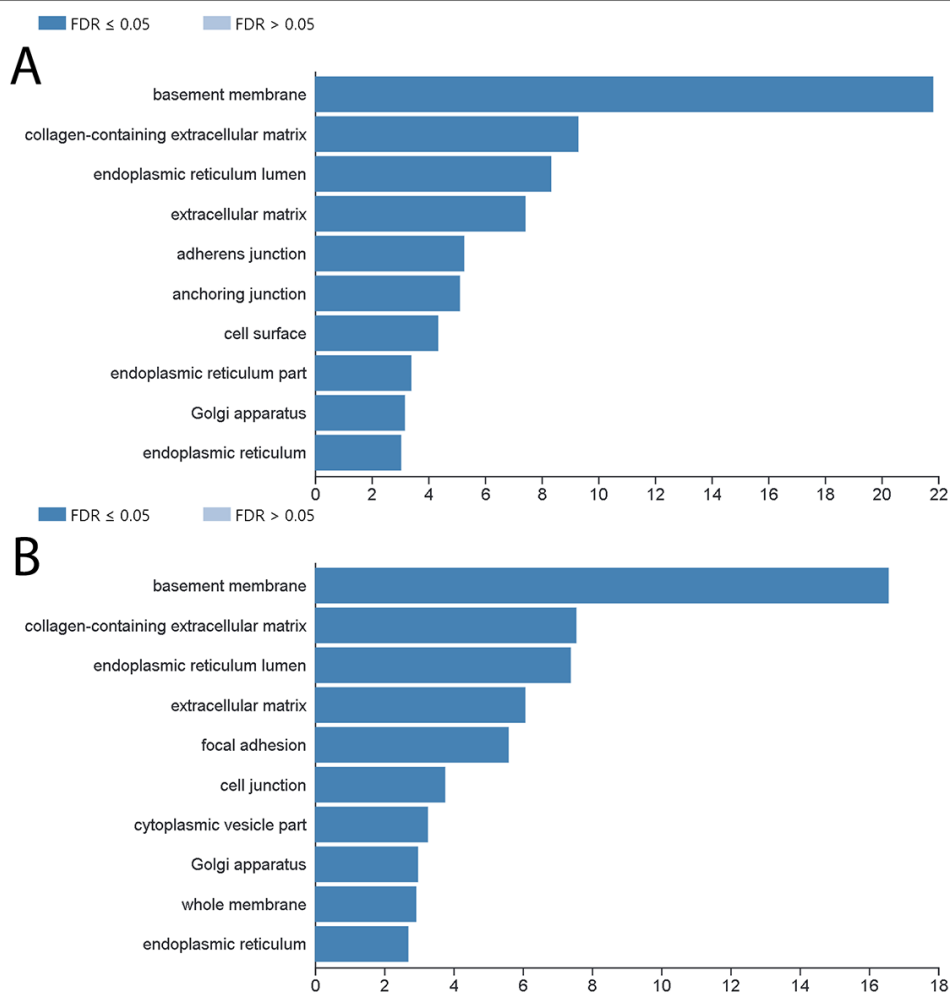


Рисунок 4. Результат аннотации дифференциально экспрессирующихся генов в терминах GO. Данные представлены для одной группы геной онтологии: клеточный компонент. Часть А представляет данные для 1 ч после заражения, часть В представляет данные для 72 ч после заражения. FDR – уровень значимости.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данном исследовании была получена стабильная линия трансформированных клеток HeLa, продуцирующая и секретирующая рекомбинантный PGLYRP1 с выходом ≈ 0.1 мг/л культуральной среды. Ранее нами были получены рекомбинантные белки PGLYRP в клетках линии Expi293, синтезируемые в виде слитых белков с легкой цепью IgG с выходом 50 мг/л культуральной среды и была определена минимальная ингибирующая концентрация (МИК) при которой ингибируется развитие $>90\%$ хламидийных включений [11]. По данным вестерн-блот гибридизации и денситометрического анализа была определена концентрация целевого белка в культуральной среде клеточных линий HeLa-PGLYRP1 (рис. 1). При заражении клеток, покрывающих 90% поверхности лунки в 0.5 мл культуральной среде было 50 нг PGLYRP1, что практически соответствует МИК (200 нг/мл).

Точный механизм действия PGLYRP на *C. trachomatis* неизвестен. Ранее нами было показано, что PGLYRP1 связывается с ЭТ хламидий. Известно, что мембрана ЭТ непроницаема для большинства молекул (крупные белки) [19]. Поскольку ЭТ являются метаболически неактивными, двухкомпонентная система ответа на стресс не включается. Было предположено, что ЭТ вместе с PGLYRP1 проникают внутрь клетки и уже там проявляется антибактериальная активность целевого белка. Для подтверждения этого было

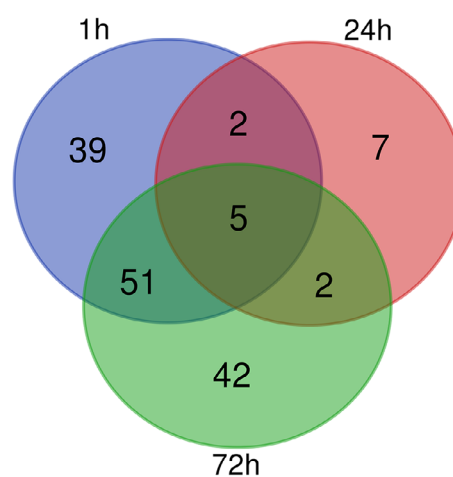


Рисунок 5. Диаграмма Венна для поиска общих дифференциально экспрессирующихся генов клеток HeLa-PGLYRP1m через 1 ч, 24 ч и 72 ч после заражения *C. trachomatis*. Диаграмма построена на основании дифференциально экспрессирующихся генов, отличающихся от контроля в 3 и более раз.

предложено изучить изменение экспрессии генов в линиях, продуцирующих рекомбинантный PGLYRP1 в ответ на заражение их элементарными тельцами *C. trachomatis* с помощью транскриптомного анализа.

На первом этапе транскриптомного профилирования после извлечения первичных данных был проведен кластерный анализ. В результате было выделено две группы, причем в одну группу попали образцы A19-A24, что соответствует данным для клеточной линии HeLa-PGLYRP1m, зараженных *C. trachomatis*. Во вторую группу попали образцы A1-A18, что соответствует данным для клеточной линии HeLa-PGLYRP1, зараженной *C. trachomatis* и незараженных линий HeLa-PGLYRP1 и HeLa-PGLYRP1m. Последующий корреляционный анализ подтвердил разделение образцов на две группы, с коэффициентом корреляции близкому к единице (0.95–1) внутри группы и коэффициентом корреляции 0.75–0.8 между группами (рис. 4). Как на рисунке 1, так и на рисунке 2 можно выделить группы A7, A9 с коэффициентом корреляции 0.85–0.9, однако никаких достоверных отличий от основной группы не было обнаружено.

Проведенный поиск дифференциально экспрессирующихся генов и последующий анализ показали, что дифференциально экспрессирующиеся гены присутствуют только в клеточной линии HeLa-PGLYRP1m, зараженной *C. trachomatis* (при установленном трехкратном значении изменения уровня экспрессии по модулю). Таким образом, было подтверждено, что транскрипционный профиль зараженных клеток HeLa-PGLYRP1m отличается от остальных образцов на всех трех временных промежутках. На основании выбранных генов была построена диаграмма. Исходя из полученных данных видно, что в группах «1 ч» и «72 ч» после заражения обнаружен 51 общий ген. В жизненном цикле хламидий серовара D выход дочерних элементарных телец приходится как раз на 72 ч [20]. Таким образом, наблюдается схожий транскриптомный профиль у клеток, подвергающихся первичному заражению (1 ч) и вторичному (72 ч).

При аннотации дифференциально экспрессированных генов в терминах GO было недостаточно данных, для временного интервала 24 ч, поэтому исследовали только 1 ч и 72 ч после заражения.

Известно, что механизм проникновения элементарных телец в эукариотическую клетку тесно связан с цитоскелетом клетки хозяина. На стадиях проникновения хламидии активно взаимодействуют с актином, микротрубочками и другими компонентами цитоскелета [21]. После проникновения в клетку, включение начинает перемещаться в перинуклеарную область клетки и остается тесно связанным с аппаратом Гольджи и ЭПР [22]. При анализе дифференциально экспрессирующихся генов в терминах генной онтологии можно выделить 20, 18 и 12 генов, относящихся к ЭПР, аппарату Гольджи и цитоскелету соответственно (рис. 4). Из-за прочной взаимосвязи жизненного цикла хламидии с цитоскелетом клетки-хозяина, изменение уровня экспрессии генов, вовлеченных в организацию цитоскелета, может сказываться на развитии хламидийной инфекции.

Ранее нами была продемонстрирована антихламидийная активность рекомбинантных PGLYRP1 человека, в результате чего существенно сокращалось количество хламидийных включений. Для уточнения механизма действия PGLYRP1 на развитие хламидийной инфекции в клетке был проведен транскриптомный анализ клеточной линии HeLa-PGLYRP1, зараженной *C. trachomatis*. В ходе исследования было показано, что рекомбинантный PGLYRP1 ингибирует развитие хламидийной инфекции в клетках

человека, что проявляется сходным транскрипционным профилем с незараженными клетками. Так же было показано, что в контрольных клетках уже через час после заражения изменяется транскрипционный профиль. Таким образом, можно предположить, что PGLYRP1 действует на хламидийную клетку не внутри эукариотической клетки, а снаружи или во время прикрепления к мембране или в культуральной среде.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

К данной статье приложены дополнительные материалы, свободно доступные в электронной версии (<http://dx.doi.org/10.18097/BMCRM00113>) на сайте журнала.

ЛИТЕРАТУРА

1. Liu, C., Xu, Z., Gupta, D., & Dziarski, R. (2001). Peptidoglycan recognition proteins: a novel family of four human innate immunity pattern recognition molecules. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**(37), 34686–34694. DOI: 10.1074/jbc.M105566200
2. Kang, D., Liu, G., Lundstrom, A., Gelius, E., & Steiner, H. (1998). A peptidoglycan recognition protein in innate immunity conserved from insects to humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**(17), 10078–10082. DOI: 10.1073/pnas.95.17.10078
3. Royet, J., & Dziarski, R. (2007). Peptidoglycan recognition proteins: pleiotropic sensors and effectors of antimicrobial defences. *Nature Reviews. Microbiology*, **5**(4), 264–277. DOI: 10.1038/nrmicro1620
4. Tydell, C. C., Yuan, J., Tran, P., & Selsted, M. E. (2006). Bovine peptidoglycan recognition protein-S: antimicrobial activity, localization, secretion, and binding properties. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **176**(2), 1154–1162. DOI: 10.4049/jimmunol.176.2.1154
5. Lu, X., Wang, M., Qi, J., Wang, H., Li, X., Gupta, D., & Dziarski, R. (2006). Peptidoglycan recognition proteins are a new class of human bactericidal proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, **281**(9), 5895–5907. DOI: 10.1074/jbc.M511631200
6. Dziarski, R., Kashyap, D. R., & Gupta, D. (2012). Mammalian peptidoglycan recognition proteins kill bacteria by activating two-component systems and modulate microbiome and inflammation. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, **18**(3), 280–285. DOI: 10.1089/mdr.2012.0002
7. Dziarski, R., & Gupta, D. (2018). How innate immunity proteins kill bacteria and why they are not prone to resistance. *Current Genetics*, **64**(1), 125–129. DOI: 10.1007/s00294-017-0737-0
8. Moulder, J. W. (1991). Interaction of chlamydiae and host cells in vitro. *Microbiological Reviews*, **55**(1), 143–190.
9. Hearn, S. A., & McNabb, G. L. (1991). Immunoelectron microscopic localization of chlamydial lipopolysaccharide (LPS) in McCoy cells inoculated with *Chlamydia trachomatis*. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, **39**(8), 1067–1075. DOI: 10.1177/39.8.1649854
10. Liechti, G. W., Kuru, E., Hall, E., Kalinda, A., Brun, Y. V., VanNieuwenhze, M., & Maurelli, A. T. (2014). A new metabolic cell-wall labelling method reveals peptidoglycan in *Chlamydia trachomatis*. *Nature*, **506**(7489), 507–510. DOI: 10.1038/nature12892
11. Bobrovsky, P., Manuvera, V., Polina, N., Podgorny, O., Prusakov, K., Govorun, V., & Lazarev, V. (2016). Recombinant human peptidoglycan recognition proteins reveal antichlamydial activity. *Infection and Immunity*, **84**(7). DOI: 10.1128/IAI.01495-15
12. Scidmore, M. A. (2005). Cultivation and Laboratory Maintenance of *Chlamydia trachomatis*. *Current Protocols in Microbiology*, Chapter 11, Unit 11A.1. DOI: 10.1002/9780471729259.mc11a01s00
13. Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1-3.
14. R Development Core Team. (2009). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Retrieved from <http://www.r-project.org>
15. Haynes, W. (2013). Benjamini–Hochberg Method. In W. Dubitzky, O. Wolkenhauer, K.-H. Cho, & H. Yokota (Eds.), *Encyclopedia of Systems Biology* (p. 78). DOI: 10.1007/978-1-4419-9863-7_1215

16. Wickham, H. (2016). ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Retrieved from <https://ggplot2.tidyverse.org>
17. Neuwirth, E. (2014). RColorBrewer: ColorBrewer Palettes
18. Bioinformatics & Evolutionary Genomics. (2019). Retrieved November 27, 2019, from <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>
19. Heinzen, R. A., & Hackstadt, T. (1997). The Chlamydia trachomatis parasitophorous vacuolar membrane is not passively permeable to low-molecular-weight compounds. Infection and Immunity, **65**(3), 1088–1094.
20. Stephens, A. J., Aubuchon, M., & Schust, D. J. (2011). Antichlamydial antibodies, human fertility, and pregnancy wastage. Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology, **2011**, 525182. DOI: 10.1155/2011/525182
21. Scidmore, M. A. (2011). Recent advances in Chlamydia subversion of host cytoskeletal and membrane trafficking pathways. Microbes and Infection, **13**(6), 527–535. DOI: 10.1016/j.micinf.2011.02.001
22. Grieshaber, S. S., Grieshaber, N. A., Miller, N., & Hackstadt, T. (2006). Chlamydia trachomatis causes centrosomal defects resulting in chromosomal segregation abnormalities. Traffic (Copenhagen, Denmark), **7**(8), 940–949. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2006.00439.x

Поступила: 07.12.2019
 После доработки: 18.12.2019
 Принята к публикации: 20.12.2019

TRANSCRIPTIONAL ANALYSIS OF HELA CELLS - PRODUCERS OF THE RECOMBINANT PEPTIDOGLYCAN RECOGNITION PROTEIN PGLYRP1 AT DIFFERENT STAGES OF THE *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* INFECTION DEVELOPMENT.

P.A. Bobrovsky *, A.K. Larin, N.F. Polina, V.N. Lazarev

Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine,
 1a Malaya Pirogovskaya str., Moscow, 119435 Russia; *e-mail: pbobrovskiy@gmail.com

Human peptidoglycan recognition proteins (PGLYRPs) are the components of innate immunity that exhibit antibacterial activity. In this study a cell line secreting recombinant PGLYRP1 into a culture medium was obtained. Transcriptional profiling of cell lines expressing PGLYRP1 was performed at different stages of *C. trachomatis* infection. Differential gene expression was studied using the whole transcriptome profiling method on the HumanHT-12 v4 Expression BeadChip microchip using the Illumina Direct Hybridization Whole-Gene Expression Assay protocol. Sample clustering followed by bioinformatics analysis revealed about 100 differentially expressed genes in response to infection with *C. trachomatis*. PGLYRP1-expressing cells infected with *C. trachomatis* had a similar transcriptional profile as non-infected cells.

Key words: *Chlamydia trachomatis*; PGLYRP; recombinant proteins; transcriptomics

Received: 07.12.2019, revised: 18.12.2019, accepted: 20.12.2019